

NEI SEBASTIÃO BRAGA GOMES

**SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE  
*Cylindrocladium spathulatum*, AGENTE CAUSAL DA  
PINTA-PRETA EM ERVA-MATE**

Dissertação de Mestrado apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Silvicultura, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

CURITIBA

2000



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**PARECER DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 314**

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pelo candidato **NEI SEBASTIÃO BRAGA GOMES** sob o título "**SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE CYLINDROCLADIUM SPATHULATUM, AGENTE CAUSAL DA PINTA-PRETA EM ERVA-MATE.**", para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Florestais, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Área de Concentração **SILVICULTURA**.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, ~~o~~ de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 11 de Dezembro de 2000

Pesq. Dr. Wagner Bettiol  
Primeiro Examinador  
EMBRAPA



Prof. Dr. Elvina Nunes Marques  
Segundo Examinador  
UFPR

Prof. Dr. Celso Garcia Auer  
Orientador e Presidente da Banca  
EMBRAPA

**NEI SEBASTIÃO BRAGA GOMES**

**SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE *Cylindrocladium*  
*spathulatum*, AGENTE CAUSAL DA PINTA-PRETA EM ERVA-MATE**

Dissertação elaborada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Área de Concentração Silvicultura, da Universidade Federal do Paraná, com a Comissão de orientação formada por:

**Prof. Dr. Celso Garcia Auer** - **Orientador**  
**EMBRAPA FLORESTAS**

**Prof. Dr. Albino Grigoletti Júnior** - **Co-orientador**  
**EMBRAPA FLORESTAS**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Lúcia R.Z. da Costa Lima** - **Co-orientadora**  
**Setor de Ciências Agrárias, UFPR**

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração Silvicultura, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos pesquisadores Dr. Celso Garcia Auer e Dr. Albino Grigoletti Júnior, da Embrapa Florestas, pela orientação, amizade, confiança e incentivo para a execução e elaboração deste trabalho.

À Prof<sup>ra</sup>. Dra. Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima, pela co-orientação, incentivo e amizade no decorrer dos trabalhos.

Ao pesquisador Dr. Wagner Bettiol, da Embrapa Meio Ambiente, pela cessão de isolados e principalmente pelas sugestões e incentivo, imprescindíveis para que este trabalho fosse realizado.

À pesquisadora Dra. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, da Embrapa Uva e Vinho, pela cessão de isolados e também pelas valiosas sugestões e incentivo .

Aos professores do Curso pelos ensinamentos e colaboração.

Ao pesquisador Dr. Álvaro Figueiredo dos Santos e ao funcionário Johann Henri Cristo Bade, da Embrapa Florestas pelo apoio e amizade recebidos.

À Chefia Geral e demais funcionários e pesquisadores da Embrapa Florestas, pelo apoio e atenção, durante este tempo de convívio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, apoio fundamental à execução deste trabalho.

À **DEUS** pela saúde, pela oportunidade, pela comissão de orientação e por tudo mais que possibilitou a realização deste trabalho...

## **AGRADEÇO**

À minha esposa Cláudia  
meus filhos, Daniel, Ana Cláudia e Rafael  
pelo amor, incentivo e confiança...

## **DEDICO**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 O PATÓGENO E SEU ISOLAMENTO.....	4
2.2 CONTROLE BIOLÓGICO.....	5
2.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
2.2.2 <i>Trichoderma</i> .....	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 ORIGENS E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS.....	12
3.1.1 ISOLAMENTO DO PATÓGENO.....	12
3.1.2 ISOLAMENTO DE ANTAGONISTAS RESIDENTES.....	13
3.1.3 OBTENÇÃO DE ANTAGONISTAS EXÓGENOS.....	13
3.1.4 RELAÇÃO DE ANTAGONISTAS.....	13
3.2 SELEÇÃO <i>IN VITRO</i> DOS ANTAGONISTAS.....	15
3.2.1 PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PELAS BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS A <i>Cylindrocladium spathulatum</i> .....	15
3.2.2 PAREAMENTO DOS FUNGOS ANTAGÔNICOS A <i>Cylindrocladium</i> <i>spathulatum</i> .....	16
3.2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PELOS ANTAGONISTAS.....	17
3.2.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	18
3.2.5 INIBIÇÃO DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS.....	18

3.3 POTENCIAL DOS ANTAGONISTAS NO CONTROLE DA DOENÇA.....	19
3.3.1 TESTE COM OS ANTAGONISTAS EM FOLHAS DESTACADAS.....	20
3.3.2 TESTE COM OS ANTAGONISTAS EM MUDAS.....	21
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PELAS BACTÉRIAS ANTAGONICAS A <i>Cylindrocladium spathulatum</i> .....	22
4.2 PAREAMENTO DOS FUNGOS ANTAGÔNICOS A <i>Cylindrocladium</i> <i>spathulatum</i> .....	22
4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PELOS ANTAGONISTAS.....	25
4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	25
4.5 INIBIÇÃO DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS.....	27
4.6 TESTE COM OS ANTAGONISTAS EM FOLHAS DESTACADAS.....	29
4.7 TESTE COM ANTAGONISTAS EM MUDAS.....	29
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
5.1 TESTES <i>IN VITRO</i> .....	32
5.2 TESTES <i>IN VIVO</i> .....	33
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

1 - ORIGEM E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DOS ANTAGONISTAS.....	14
2 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Cylindrocladium spathulatum</i> POR BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS.....	24
3 - COLONIZAÇÃO DE <i>Cylindrocladium spathulatum</i> POR FUNGOS ANTAGÔNICOS.....	24
4 - EFEITO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ANTAGONISTAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Cylindrocladium spathulatum</i> .....	26
5 - EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ANTAGONISTAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Cylindrocladium spathulatum</i> .....	26
6 - EFEITO DE BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS (%) DE <i>Cylindrocladium spathulatum</i> .....	28
7 - EFEITO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS DE <i>Trichoderma</i> sp. SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>Cylindrocladium spathulatum</i> .....	28



## LISTA DE FIGURAS

- 1 - PINTA-PRETA DA ERVA-MATE CAUSADA POR *Cylindrocladium*  
*spathulatum*: A. SINTOMA DA INFECÇÃO EM FOLHA. B. MANCHA  
FOLIAR EM MUDAS. C. QUEDA DE FOLHAS NO CAMPO..... 3
- 2 - EFEITO DE ANTAGONISTAS SOBRE A INCIDÊNCIA DE *C.*  
*spathulatum* EM FOLHAS DE ERVA-MATE..... 30
- 3 - EFEITO DE ANTAGONISTAS SOBRE A INCIDÊNCIA DE *C.*  
*spathulatum* EM MUDAS DE ERVA-MATE..... 31

## RESUMO

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., como qualquer espécie vegetal está sujeita a doenças, que podem provocar prejuízos ou até mesmo inviabilizar seu cultivo. Entre estas, encontra-se a pinta-preta causada por *Cylindrocladium spathulatum* El Gholi, Kimbrough, Barnard, Alfieri & Schoulties, principal doença foliar desta cultura. Ela pode causar perdas significativas, tanto em viveiro, quanto em plantios e, até o momento, tem sido controlada com fungicidas, mesmo sem existir produtos registrados. O principal objetivo deste trabalho foi selecionar e avaliar antagonistas visando o controle biológico da pinta-preta. Em uma primeira fase, foi feito o isolamento de antagonistas, em seguida foram feitos testes em laboratório, *in vitro*, e, após a seleção inicial, fez-se a avaliação do potencial antagônico dos melhores isolados em testes com folhas destacadas e em mudas, na casa-de-vegetação. Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Florestas, Colombo/PR. Os microrganismos antagônicos residentes utilizados foram isolados de (1) solo infectado com o patógeno, proveniente de plantio comercial em São Mateus do Sul/PR; (2) lavagem de folhas de erva-mate nativa em Colombo/PR; e (3) purificação de colônias de microrganismos surgidas em isolamento de lesões de pinta-preta. Os outros microrganismos foram procedentes de Jaguariúna/SP (isolados de *Bacillus subtilis*) e Bento Gonçalves/RS (isolados de *Trichoderma*). O experimento inicial foi executado em placas de Petri, acondicionadas em câmara de germinação "BOD" à temperatura de  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e luz fria alternada (12/12 h), utilizando-se 30 isolados de fungos e bactérias, residentes ou não em erva-mate. Posteriormente, foram selecionados 3 isolados de bactérias e 3 de *Trichoderma*, que apresentaram maior percentual de inibição, em teste de produção de antibióticos e no teste de hiperparasitismo, respectivamente. Esses 6 isolados foram empregados nos testes subsequentes com papel celofane, placas sobrepostas e inibição de germinação de esporos e, ainda, em folhas destacadas (laboratório) e em mudas (casa-de-vegetação). Concluiu-se que os métodos *in vivo* foram considerados mais adequados para a seleção de antagonistas que os métodos *in vitro*. Os isolados de bactérias, de um modo geral, foram mais eficientes que de *Trichoderma*. Os melhores resultados foram obtidos com o isolado AP-49 (*B. subtilis*) com 10% de incidência da doença, contra 90% de incidência na testemunha, em mudas. Estes resultados indicam a possibilidade do uso de antagonistas no controle da pinta-preta da erva-mate.

**Palavras-chave:** doença, pinta-preta, controle biológico, microrganismos.

**Título:** SELEÇÃO DE ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DE *Cylindrocladium spathulatum*, AGENTE CAUSAL DA PINTA-PRETA EM ERVA-MATE

## ABSTRACT

As any other plant, diseases that may cause damage or make its culture unprofitable can affect mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). Among them, leaf spot caused by *Cylindrocladium spathulatum* Morgan, is the main leaf disease in this culture. It can produce significant losses in nurseries and field. Nowadays, the control is done with fungicide, without proper recommendation. This work aimed to select antagonists for biological control. The first phase was the collection of antagonists followed by laboratory tests *in vitro*. After the initial selection, the antagonistic potential of the best isolates was evaluated *in vivo* with seedlings in the greenhouse. The experiments were carried on at Embrapa Florestas in Colombo/PR. Resident antagonistic microorganism were isolated from (1) infected soils from São Mateus do Sul commercial plantations, (2) from washed leaves of native mate in Colombo/PR and, (3) from contamination occurred during leaf spot isolation. Other microorganisms were acquired from Jaguariúna/SP (*Bacillus subtilis* isolates) and Bento Gonçalves/RS (*Trichoderma* isolates). The initial experiment was carried out with 30 fungus and bacteria isolated or not from mate in Petri dishes placed in germination cameras "BOD" with  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  temperature and alternated light (12/12h). Afterwards, three bacteria isolates and three *Trichoderma* isolates, that showed higher inhibition on antibiotic production assay and hyperparasitism assay, respectively, were selected. These six isolates were tested on cellophane paper, overlap dishes and spore germination inhibition, and also on detached leaves (laboratory) and seedlings (greenhouse). It was concluded that *in vivo* methods were more adequate to select antagonists than *in vitro* methods. The best results were obtained with AP-49 (*B. subtilis* isolate) showing 10% of disease incidence against 90% of disease incidence observe on the control. The results indicate the possibility of antagonists on the mate leaf spot control.

**Key Words:** biological control, foliar disease, microorganisms.

**Title:** SELECTION OF ANTAGONISTS FOR THE CONTROL OF *Cylindrocladium spathulatum*, THE CAUSAL AGENT OF MATE LEAF SPOT.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) tem uma grande importância econômica na Região Sul do Brasil e nos países vizinhos como Argentina e Paraguai. Esta cultura tem papel estratégico na economia dessas regiões, com o mercado consumidor se expandindo de forma significativa, tanto por meio do aumento de demanda, como de novos mercados consumidores. No período de 1970 a 1992, o crescimento foi da ordem de 83,59%, na região Sul do Brasil, onde desempenha um importante papel sócio-econômico, cultural e ambiental, principalmente na pequena propriedade agrícola (RODIGHERI et al., 1996).

Toda produção ervateira foi inicialmente baseada em extrativismo, mas com o aumento da demanda, tornou-se necessária a implantação de áreas de produção. Ao mesmo tempo em que houve um incremento de áreas, os problemas fitossanitários também foram aumentando. No entanto, poucos estudos foram realizados sobre a presença e a importância das doenças.

A domesticação de uma planta e o desenvolvimento de sua cultura pode alterar o equilíbrio natural que havia entre a planta e os microrganismos associados, entre os quais se encontram os patógenos. Fungos pouco importantes em ervais nativos, tornam-se preocupantes em ervais cultivados devido ao aumento da densidade de plantas ou pelo manejo inadequado das plantas.

Os primeiros registros da literatura abordando problemas de doenças em erva-mate, segundo GRIGOLETTI JÚNIOR et al. (1996), foram feitos por SPEGAZZINI (1908), na Argentina, descrevendo uma série de fungos associados à

erva-mate. Mais tarde, neste mesmo país, MARCHIONATTO (1948) apresentou novos relatos sobre enfermidades da erva-mate.

No Brasil, a abordagem deste assunto iniciou-se com os trabalhos de MAUBLANC (1913) e de GRILLO (1936), os quais compilaram informações sobre os fungos associados à erva-mate, sem a determinação de sua patogenicidade. Posteriormente, no Paraná, VELLOZO et al. (1949) e NOWACKI (1954) relataram algumas doenças e a descrição de fungos associados à cultura da erva-mate.

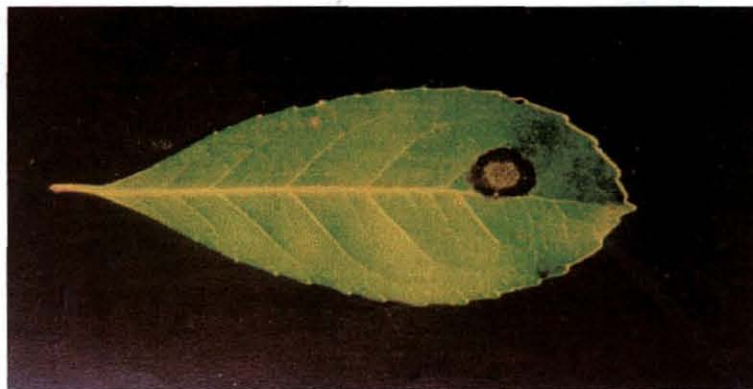
AUER & GRIGOLETTI JÚNIOR (1995) revisando o assunto doenças da erva-mate, destacaram a mancha da folha (pinta-preta), causada pelo fungo *Cylindrocladium spathulatum* El-Gholl, Kimbrough, Barnard, Alfieri & Schoulties. Os sintomas são as manchas circulares, de 3 a 6 mm de diâmetro, zonadas, escuras, com a parte central necrosada (Figura 1A). Os sinais são as frutificações tênues do fungo, na face inferior da folha. Esta é a principal doença da cultura, pois causa prejuízos, tanto em viveiros (Figura 1B), como em plantios no campo (Figura 1C); em viveiros, ocorre grande perda de plântulas e de mudas repicadas.

O controle químico de *C. spathulatum* têm sido utilizado em viveiro, mas no Brasil, não existe produto registrado para a cultura. Esta medida de controle apresenta alguns inconvenientes, como por exemplo a contaminação ambiental, a possibilidade de resistência do patógeno ao princípio ativo pelo uso repetido, o período de carência, quando se tratar de folhas que serão utilizadas para o consumo e outros. Um estudo mais aprofundado de técnicas alternativas de controle (cultural e biológico) para solucionar os problemas causados por esta doença, é justificável, pois o produto consumido é a folha, tanto em chimarrão, como na forma de chá-mate, que pode ser facilmente contaminado com os pesticidas.

O objetivo do trabalho foi selecionar microrganismos antagônicos a *C. spathulatum*, agente causal da pinta-preta da erva-mate e adequar metodologia, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, para essa seleção.

FIGURA 1 - PINTA-PRETA DA ERVA-MATE CAUSADA POR *Cylindrocladium spathulatum*: A.SINTOMA DA INFECÇÃO EM FOLHA. B.MANCHA FOLIAR EM MUDAS. C.QUEDA DE FOLHAS NO CAMPO.

**A**



**B**



**C**



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O PATÓGENO E SEU ISOLAMENTO

O gênero *Cylindrocladium* foi primeiramente relatado por MORGAN, em 1892, com a descrição da espécie *C. scoparium* (CROUS & WINGFIELD, 1994). Posteriormente, o gênero foi dividido por BOEDJIN & REITSMA (1950)<sup>1</sup>, em sete espécies e por PEERALLY (1991)<sup>2</sup>, em 26 espécies, segundo CROUS & WINGFIELD (1994).

Este gênero pertence à subdivisão Deuteromycotina; classe Hyphomycetales; família Moniliaceae, tendo como características, a produção de conídios com um a sete septos, cilíndricos, situados em fiálides de conidióforos e com uma hifa especializada com um ápice alargado (vesícula). O estágio vegetativo deste fungo produz micélio branco a marrom, clamidosporos e microescleródios (HUNTER & BARNETT, 1978).

*C. spathulatum* tem macroconidióforos septados, hialinos e com vesículas clavadas a espatuladas; conidióforos primários não septados ou raramente com um septo, fiálides alongadas, doliforme a reniforme, hialinas e não septadas. Os conídios são cilíndricos, hialinos, septados e arredondados em ambas extremidades, com dimensões de 48 - 75 x 4 - 6  $\mu\text{m}$  (CROUS & WINGFIELD, 1994).

O gênero têm sido associado com várias plantas hospedeiras, causando uma grande diversidade de doenças, sendo facilmente isolado de folhas doentes para meio de cultura (FERREIRA, 1989). No método direto, conídios e micélio de

---

<sup>1</sup> BOEDJIN, K.B. & REITSMA, J. Notes on the genus *Cylindrocladium*. *Reinwardtia* v.1, p.51-60, 1950.

<sup>2</sup> PEERALLY, A. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. *Mycotaxon* v.40, p.323-366, 1991.

*Cylindrocladium* spp. são retirados das superfícies das manchas com auxílio de estilete de ponta fina, após sua visualização sob microscópio estereoscópico, e transferidos para meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). A esporulação de *Cylindrocladium* spp. pode ser estimulada colocando-se as folhas com manchas em câmaras úmidas por um período de 36 a 72 horas. No método indireto, retiram-se fragmentos foliares das bordas das manchas, sendo esses passados, de maneira rápida e consecutiva, em álcool, água oxigenada ou hipoclorito de sódio em concentrações e tempos determinados, sendo depois transferidos para meio BDA.

## 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO

Poucas são as informações a respeito do controle biológico em espécies florestais, para que fossem tomados como referência. Por este motivo, a revisão se baseou principalmente em relatos sobre pesquisas com culturas agrícolas anuais e perenes, onde os danos econômicos tem despertado maior interesse comercial e, também, o uso de agrotóxicos é mais intenso.

Na abordagem de controle biológico, segundo BETTIOL (1991a), doença é mais do que uma íntima relação do patógeno com o hospedeiro influenciada pelo ambiente. É o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro. Com esta abordagem precisa ser considerado o fator ambiente, agindo sobre o hospedeiro, o patógeno e os demais organismos do sítio de infecção. Portanto, patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num

---



sistema biológico, são fatores componentes do controle biológico. A maneira mais tradicional de se definir controle biológico de doenças de plantas é considerá-lo como o controle de um microrganismo com outro microrganismo.

O sucesso do controle biológico de doenças da parte aérea da planta (filosfera) depende do modelo biológico escolhido. O modelo dará indicações sobre qual o mecanismo de ação é mais adequado para o controle, qual o local apropriado para o isolamento de antagonistas e qual a estratégia de seleção e desenvolvimento do bioagente.

BLAKEMAN et al. (1992)<sup>3</sup>, citados por BETTIOL (1997), reconhecem como uma das vantagens do controle biológico, em relação ao químico, a capacidade de o bioagente se adaptar e sobreviver no habitat no qual ele foi aplicado e, com isso, persistir por longos períodos sem a necessidade de reaplicações, como ocorre com os fungicidas. Ainda, BLAKEMAN & FOKKEMA (1982)<sup>4</sup>, citados por BETTIOL (1997), descrevem que, para um antagonista ser bem sucedido, este deve, preferencialmente, ter a capacidade de se multiplicar e de colonizar a superfície foliar. Entretanto, devido às condições existentes nesse ambiente há necessidade de adequá-lo ao seu estabelecimento. A adequação tanto pode ser do antagonista, como da filosfera. Em relação ao antagonista, existem diversas formas de torná-lo mais adequado ao uso: a formulação do agente para conferir resistência ao ressecamento e a exposição à luz ultravioleta; a seleção de organismos adaptados a esse ambiente; o uso de indutores de resistência em tratamento de sementes e outras partes da planta. Em relação ao ambiente, essa adequação é possível de ser

---

<sup>3</sup> BLAKEMAN, J. P.; BROWN, A. E. & MERCER, P. C. Biological control of plant diseases-present and future trends. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, p.151-164, 1992.

<sup>4</sup> BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review. of Phytopathology*, v.20, p.167-192, 1982.

obtida apenas em condições de cultivo controlado ou por meio de manipulação das condições nutricionais da filosfera.

Para cada patossistema, existe um local mais apropriado para realizar a seleção de antagonistas, porém as chances de obtenção de microrganismos efetivamente antagônicos são aumentadas fazendo-se isolamentos no ambiente onde serão usados. Dessa forma, aqueles originários do filoplano possivelmente serão os mais adequados a esse ambiente. Entretanto, podem ser empregados com sucesso, os antagonistas que ocorrem em outros habitats. No primeiro caso, são conhecidos como antagonistas residentes ou que ocorrem naturalmente, e no segundo, como antagonistas exógenos na cadeia alimentar (BETTIOL, 1991b). Pesquisas vêm sendo realizadas sobre a seleção e o uso de antagonistas para o controle de doenças, destacando-se *Bacillus subtilis* e espécies de *Trichoderma*.

### 2.2.1 *Bacillus subtilis*

Segundo BETTIOL (1997), *B. subtilis* é uma bactéria encontrada em várias partes da planta, que apresenta potencial antagônico contra patógenos do filoplano. BETTIOL & KIMATI (1989) obtiveram um grande número de isolados dessa bactéria, antagônicos a *Pyricularia oryzae*, a partir do filoplano de arroz. Apesar da capacidade antagônica demonstrada por esses isolados (BETTIOL & KIMATI, 1990), os autores não obtiveram sucesso no controle da brusone em condições de campo (BETTIOL, comunicação pessoal).

Com isolados de *B. subtilis*, originários do filoplano de arroz e de *Eucalyptus*, BETTIOL & VARZEA (1992) demonstraram a efetividade desse antagonista em inibir a germinação de uredíniosporos de diferentes raças de *Hemileia vastatrix* e de

controlar a ferrugem, em condições de casa-de-vegetação. Posteriormente, trabalhando com células e metabólitos desses isolados, BETTIOL et al. (1994) obtiveram controle de 100% da ferrugem (*H. vastatrix*) do cafeeiro quando da pulverização, de mudas de café catuaí, com 1.000 e 10.000 µg/ml de produto contendo metabólitos de *B. subtilis*. Em condições controladas, *B. subtilis*, isolado do filoplano de feijoeiro e de outras plantas, tem se mostrado efetivo no controle da ferrugem do feijoeiro (BETTIOL et al., 1992; CENTURION & KIMATI, 1994ab; MIZUBUTI et al., 1995), a exemplo do que havia sido conseguido por BAKER et al. (1983 e 1985), com um isolado de solo, tanto em laboratório como no campo.

Outros autores demonstraram a efetividade de *B. subtilis* em controlar, também, a queima das folhas (*Curvularia eragrostidis*) do inhame em casa-de-vegetação (ANDRADE et al., 1995). Apesar de todo o sucesso do uso de *B. subtilis* em condições controladas, existe a necessidade de realização dos testes nas condições de campo.

Dois estudos foram desenvolvidos com esta bactéria para o controle de doenças florestais. No primeiro caso, BETTIOL et al. (1988) testaram o antagonismo de um isolado de *Bacillus* sp., obtido da superfície foliar de *Eucalyptus grandis*, contra o patógeno *C. scoparium*, por meio de pulverização, horas antes da inoculação do fungo. A aplicação de *Bacillus* sp. apresentou controle semelhante ao de benomyl, demonstrando ser possível a utilização desta bactéria e de seus metabólitos no controle do fungo. No segundo caso, SANTOS et al. (1998) avaliaram o efeito de vinte e quatro isolados de *B. subtilis*, antagônicos a *P. oryzae*, sobre *Puccinia psidii*, agente causal da ferrugem do eucalipto. Três desses isolados foram provenientes de folhas de eucalipto, enquanto os demais foram procedentes de

folhas de arroz. Os isolados bacterianos foram testados *in vitro*, sob a forma de caldo fermentado, caldo fermentado autoclavado e sobrenadante, quanto à capacidade de inibição de uredíniosporos do patógeno. Todos os isolados reduziram a germinação dos uredíniosporos nas três formas empregadas, demonstrando que os metabólitos produzidos por *B. subtilis* são termoestáveis e a inibição independe da presença de células vivas.

### 2.2.2 *Trichoderma*

*Trichoderma*, é um fungo imperfeito, pertencente a classe Deuteromycotina; Hifomiceto, Moniliaceae; Gloriosporae, e de grande importância para o controle biológico.

De modo geral, *Trichoderma* tem sido encontrado parasitando uma série de fungos fitopatogênicos, inclusive aqueles formadores de escleródios. No entanto, *Trichoderma* spp. têm seus próprios parasitas e, portanto, é provável que, em alguns casos, o seu estabelecimento em um outro ambiente seja suprimido por outros microrganismos já adaptados.

A literatura apresenta alguns exemplos do uso de *Trichoderma* para o controle de doenças. GHINI & VITTI (1993) verificaram que *Trichoderma*, isolado de solo onde se cultivava morangueiro, sobreviveu por longo período nas folhas de morangueiro. Esse antagonista típico de solo vem sendo testado para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em diferentes culturas. ZIMAND et al. (1996) verificaram que *T. harzianum* isolado T39 reduziu a germinação e a elongação do tubo germinativo de *B. cinerea* em folhas de feijoeiro. Entretanto, a redução da germinação não resultou na completa prevenção do desenvolvimento da doença nas

folhas. Enquanto na testemunha a folha foi totalmente necrosada, na presença do antagonista a necrose foi em 50% da área foliar. ELAD et al. (1993)<sup>5</sup> e ELAD & SHTINBERG (1996)<sup>6</sup>, citados por BETTIOL (1997), demonstraram a efetividade de *T. harzianum* T39 (Trichodex) em adição a fungicidas no controle de *B. cinerea*, em pepino.

Apesar dos sucessos relatados para o controle de *B. cinerea*, o uso de *Trichoderma* para o controle de outras doenças da filosfera não tem sido bem sucedido. MICHEREFF et al. (1993a) demonstraram que diversos isolados de *Trichoderma* foram efetivos na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo. Entretanto, MICHEREFF et al. (1993b), em estudos conduzidos em casa-de-vegetação, concluíram que o conjunto de resultados obtidos, principalmente quanto à baixa eficiência no controle da doença e à baixa persistência da ação antagônica, revela que os isolados de *Trichoderma* testados não foram efetivos como agentes potenciais de biocontrole no patossistema *C. graminicola*-sorgo

Os resultados promissores do controle biológico são alcançados, em sua maioria, em solo esterilizado ou em solo infestado naturalmente sob um ambiente controlado, em casa-de-vegetação. HADAR et al. (1979) obtiveram um isolado de *T. harzianum* que ataca o micélio de *R. solani*. e que ao ser aplicado ao solo infestado artificialmente com o patógeno, controlou efetivamente o tombamento de plântulas de feijão, de tomate e de berinjela. Todavia, tem-se reportado a eficiência de

---

<sup>5</sup> ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination on alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under comercial greenhouse conditions. **Plant Pathology**, v.42, p.324-332, 1993.

<sup>6</sup> ELAD, Y.; SHTINBERG, D. *Trichoderma harzianum* T39 (Trichodex) integrated with fungicides for the control of grey mould of strawberry, vegetable greenhouse-crops and grapes. In: Wenhua, T.; Cook, R.S.; Rovira, A. (Ed.). **Advances in biological control of plant diseases**, p.310-319, 1996.

*Trichoderma* sob condições naturais. Em condições de campo, em solo naturalmente infestado com *R. solani*, uma preparação de *T. harzianum* com farelo de trigo reduziu, em aproximadamente 50%, a incidência da doença em algodão, 29 dias após o plantio (ELAD et al., 1980). Em outro experimento com tomate, plantado em solo naturalmente infestado com *Sclerotium rolfsii*, *T. harzianum* reduziu em 20% a porcentagem de plantas doentes (ELAD et al., 1980).

Em outro patossistema, ROCHA & OLIVEIRA (1998), utilizando três isolados de *T. koningii* (Ti2, Ti17 e Ti25), obtidos da rizosfera do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), e um isolado de *T. harzianum* (T-25), de conhecido potencial antagônico a *Colletotrichum gloesporioides*, *in vitro*, avaliaram o biocontrole do fitopatógeno em frutos destacados e plantas de maracujá. Os antagonistas limitaram a ação do fitopatógeno em frutos, reduzindo a área necrosada em torno de ferimentos na epiderme. O isolado Ti17, de *T. koningii*, apresentou o melhor desempenho no biocontrole de antracnose em frutos. Avaliado em plantas, o isolado Ti17, inoculado com 24 horas de antecedência ao fitopatógeno, reduziu a área necrosada em torno de ferimentos em folhas de maracujazeiro. A capacidade de se estabelecer no novo ambiente e se tornar resistente à microflora residente, persistindo no filoplano por mais de 30 dias, associado ao potencial antagônico apresentado, sugerem que o isolado Ti17 é um promissor agente de biocontrole de *C. gloesporioides*, indicando a possibilidade do uso de *Trichoderma* para controle da antracnose do maracujazeiro no campo e pós-colheita.

Dentre outras estratégias de uso de *Trichoderma*, MELO (1991) sugere que a indução de resistência a fungicidas para esta antagonista e a seleção de linhagens geneticamente estáveis, para uso em combinações com fungicidas é uma das várias possibilidades para o controle efetivo de um ou mais patógenos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi executado em três etapas, primeiramente *in vitro*, para selecionar os antagonistas quanto à sua ação antagônica frente ao patógeno e também a capacidade de multiplicação em meio de cultura. Após a seleção inicial, os antagonistas foram testados em folhas destacadas, método este, que visou avaliar a capacidade de adaptação do antagonista ao filoplano. Para consolidar os resultados, obtidos anteriormente, foi executado o teste *in vivo*, em mudas, na casa-de-vegetação, visando se aproximar das condições de campo. O estudo foi desenvolvido no período de novembro de 1998 a abril de 2000. Todos os ensaios foram montados em delineamento experimental inteiramente casualizado.

As concentrações de conídios de *C. spathulatum* utilizadas foram superiores a  $10^5$  conídios/ml, concentração esta considerada como eficiente em estudos de patogenicidade deste fungo em *Ilex* e *Eucalyptus* feitos por LAU & GRIGOLETTI JUNIOR (1997). O inóculo de *C. spathulatum* foi obtido por meio da lavagem, de culturas puras em placas com meio BDA, com água esterilizada, as quais haviam sido mantidas por 30 dias em condições ambiente de laboratório.

#### 3.1 ORIGEM E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS

##### 3.1.1 ISOLAMENTO DO PATÓGENO

O isolado de *C. spathulatum*, usado nos testes como patógeno-alvo, foi originário de Colombo/PR, a partir de mudas de erva-mate com a doença. Esse

isolado, monospórico, pertence à coleção do Laboratório de Fitopatologia, da Embrapa Florestas.

### 3.1.2 ISOLAMENTO DE ANTAGONISTAS RESIDENTES

O isolamento dos microrganismos foi feito em meio BDA (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar/ litro de meio de cultura), por meio de diferentes procedimentos:

- a) peneiramento de solo infestado, proveniente de áreas plantadas com erva-mate, e plaqueamento das partículas de matéria orgânica em BDA.
- b) lavagem de folhas de erva-mate nativa, com água esterilizada e plaqueamento da suspensão em BDA.
- c) purificação de colônias de microrganismos surgidas em isolamento de lesões de pinta-preta, que apresentaram halo de inibição em relação a *C. spathulatum*.

### 3.1.3 OBTENÇÃO DE ANTAGONISTAS EXÓGENOS

Os isolados obtidos de outras culturas foram fornecidos por outras unidades da Embrapa: (1) *B. subtilis* - Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP e (2) *Trichoderma* sp. - Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS.

### 3.1.4 RELAÇÃO DE ANTAGONISTAS

A relação de todos os isolados dos antagonistas utilizados, assim como suas origens e procedências estão discriminados na Tabela 1.



TABELA 1 - ORIGEM E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DOS ANTAGONISTAS

Antagonista	Identificação	Origem	Procedência
*T-1	<i>Trichoderma</i> sp.	solo	São Mateus do Sul/PR
*T-2	"	"	"
TSS-3	"	-	CNPUV
*T-4	Fungo não identificado	solo	São Mateus do Sul/PR
*T-5	"	"	"
*T-6	"	folhas de erva-mate	Colombo/PR
*T-7	"	"	"
*T-8	"	solo	São Mateus do Sul/PR
TSS-9	<i>Trichoderma</i> sp.	-	CNPUV
*T-10	Fungo não identificado	folhas de erva-mate	Colombo/PR
*T-11	"	"	"
T-12	<i>Trichoderma</i> sp.	-	CNPUV
TSS-13	"	-	"
*T-14	Fungo não identificado	folhas de erva-mate	Colombo/PR
T-15	"	-	CNPUV
T-15E	<i>Trichoderma</i> sp.	-	"
*T-16	Fungo não identificado	folhas de erva-mate	Colombo/PR
T-19	<i>Trichoderma</i> sp.	-	CNPUV
*B-1	Bactéria não identificada	folhas de erva-mate	Ponta-Porã/MS
*B-2	"	"	Colombo/PR
*B-3	"	"	"
*B-4	"	"	"
*B-5	"	"	"
*B-6	"	"	"
*B-8	"	"	"
*B-9	"	"	"
*B-10	"	solo	"
AP-3	<i>Bacillus subtilis</i>	"	CNPMA
AP-49	"	folhas de arroz	"
AP-51	"	"	"

(\*) Isolados obtidos no Laboratório de Fitopatologia. Isolados sem asterisco foram cedidos pela Embrapa Meio Ambiente (CNPMA) e Embrapa Uva e Vinho (CNPUV).

### 3.2 SELEÇÃO *IN VITRO* DOS ANTAGONISTAS

#### 3.2.1 PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PELAS BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS A *Cylindrocladium spathulatum*.

Porções de 200 ml de BD (Batata-Dextrose) foram acondicionadas em frascos de Erlenmeyer, e nestes foram transferidos discos de meio BDA contendo as bactérias. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação, em uma temperatura de  $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz. Findo esse período, foram adicionados 3 g de ágar em cada frasco e estes foram autoclavadas por 20 minutos a  $120^{\circ}\text{C}$ , e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri, de 90 mm de diâmetro.

No centro das placas, foram transferidos discos de cultura do patógeno e, após, foram mantidos por 18 dias à temperatura de  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , sob alternância de luz/escuro (12/12h), em câmara de germinação tipo BOD.

A avaliação do potencial de antagonismo foi feita, após o período de incubação, medindo-se os diâmetros das colônias do patógeno, comparando-se com a testemunha, cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA.

Os três melhores isolados, que apresentaram maior percentual de inibição, foram selecionados para os testes subsequentes.

### 3.2.2. PAREAMENTO DOS FUNGOS ANTAGÔNICOS A *Cylindrocladium spathulatum*

Para avaliar o antagonismo dos isolados, por meio do hiperparasitismo, foi utilizado o pareamento de culturas em placas de Petri contendo meio BDA. Cada antagonista foi testado em dez repetições, e da mesma forma a testemunha (patógeno), crescendo sem a presença de antagonista.

Para as placas foram transferidos, de um lado, um disco de cultura do patógeno e do outro, um disco de cultura do antagonista, ambos a 2,0 cm da borda da placa, em posições opostas. Os discos foram retirados de culturas puras dos antagonistas incubadas, em condições de ambiente de laboratório, por 7 dias e, do patógeno, por 30 dias. Após a transferência, as placas foram mantidas em condições de temperatura de  $22 \pm 0,5$  °C, sob alternância de luz/escuro (12/12 h), em câmara de germinação tipo BOD.

O potencial de antagonismo dos isolados foi avaliado três dias após a data de transferência dos organismos, adaptando-se a metodologia proposta por BELL et al. (1982), que estabelece o grau de antagonismo, por meio da divisão em cinco classes de notas, conforme se descreve abaixo:

Nota 1 : O antagonista cobriu a totalidade da superfície da placa.

Nota 2 : O antagonista cobriu ao menos 2/3 da superfície .

Nota 3 : O antagonista cobriu ao menos 50% da superfície.

Nota 4 : O patógeno cobriu ao menos 2/3 da superfície.

Nota 5 :O patógeno cobriu a totalidade da superfície, anulando o antagonista.

Para facilitar a análise, as notas foram transformadas em percentagem de colonização. Desse modo, foram adotadas as percentagens de 100, 75, 50, 25 e

zero, para as notas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. No caso da testemunha (patógeno) mediu-se o diâmetro da colônia, na mesma ocasião.

Para os testes subsequentes foram selecionados três isolados de fungos, que apresentaram maior percentual de hiperparasitismo.

### 3.2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PELOS ANTAGONISTAS

Para essa avaliação utilizou-se o método do papel celofane descrito por GIBBS (1967)<sup>7</sup>, citado por MARIANO (1993). Este teste consiste na transferência de um disco de crescimento do antagonista (fungo ou bactéria) para o centro de placas de Petri contendo meio BDA, sobreposto por papel celofane lavado e esterilizado. O teste foi realizado com os isolados de bactérias e de *Trichoderma* selecionados. Após sete dias da transferência do antagonista para a superfície do papel celofane, retirou-se este papel com o crescimento aderente e transferiu-se um disco de meio BDA com o patógeno para o centro da placa. A avaliação foi feita sete dias após a inoculação, medindo-se os diâmetros das colônias do patógeno em contato com os metabólitos produzidos pelos antagonistas, comparando-se com a testemunha. A testemunha consistiu no cultivo do patógeno após a retirada do celofane, sem a prévia sobreposição do antagonista.

---

<sup>7</sup> GIBBS, J.N. A study of the epiphytic growth habit of *Fomes annosus*. *Annals of Botany*, v.31, p.755-774, 1967.

### 3.2.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Para essa avaliação foi utilizada a metodologia proposta por DICK & HUTCHINSON (1966)<sup>8</sup>, citados por MARIANO (1993). Em uma placa de Petri, contendo BDA, colocou-se um disco de cultura do patógeno e em outra colocou-se um disco de cultura do antagonista. A placa com o patógeno ficou sobreposta à placa com o antagonista e estas foram envolvidas por filme plástico. A incubação ocorreu em condições ambiente de laboratório e a avaliação foi realizada 11 dias após a montagem do experimento, por meio da medição dos diâmetros das colônias do patógeno, comparando-os com a testemunha. No caso da testemunha, sobrepôs-se a placa com o patógeno com uma outra contendo somente o meio BDA.

### 3.2.5 INIBIÇÃO DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

Para os isolados de bactérias foi utilizado o caldo nas formas natural (cru) e autoclavado, nas concentrações de 10%; 50% e 100%. Para a produção do caldo, cultivou-se as bactérias em meio líquido BD por 15 dias numa temperatura de  $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz.

Para os antagonistas do gênero *Trichoderma* foi utilizada a suspensão de conídios, obtida da lavagem com água esterilizada de colônias cultivadas em placas de Petri, durante sete dias, em condições ambiente de laboratório. Assim obteve-se as concentrações de  $1,6 \times 10^7$ ;  $7,3 \times 10^4$  e  $2,2 \times 10^7$  conídios/ml para os isolados T-1, TSS-9 e T-12, respectivamente.

---

<sup>8</sup> DICK, C.M.; HUTCHINSON, S.A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, n.211, p.868, 1966.

Para o patógeno utilizou-se uma suspensão de conídios na concentração de  $10^5$  conídios/ml. Os esporos foram retirados de colônias cultivadas por 30 dias em placas com BDA, em condições ambiente de laboratório. A concentração de esporos foi determinada em câmara de Neubauer, sob microscópio ótico.

Para a realização dos testes utilizou-se dois discos de meio de cultura ágar-água, com diâmetro de 18 mm, sobre uma lâmina de microscópio apoiada em suporte de vidro em forma de "V", colocados em placa de Petri. Sobre os discos de meio de cultura colocou-se uma gota da suspensão de esporos do patógeno e, sobre esta, adicionou-se uma gota de suspensão dos antagonistas. Após três horas de incubação, à temperatura ambiente, foi feita a contagem de conídios germinados do patógeno, comparando-se com a testemunha (ausência dos antagonistas).

Para determinar o percentual de germinação foram contados 100 conídios do patógeno que apresentaram, ao menos o início da formação do tubo germinativo.

### 3.3 POTENCIAL DOS ANTAGONISTAS NO CONTROLE DA DOENÇA

Neste estudo foram utilizados os três isolados de bactérias e três de *Trichoderma* spp, previamente selecionados nos itens 3.2.1. e 3.2.2.

Para a produção dos metabólitos, os discos de cultura das bactérias foram inoculados em meio líquido BD e incubados sob agitação, em condições ambiente de laboratório, durante de 15 dias. Para cada isolado de bactéria, o caldo foi utilizado de três diferentes formas:

N: Produto natural (sem autoclavagem e filtragem)

A: Produto autoclavado por 20 minutos a 120°C.

F: Produto filtrado em filtro "millex" (millipore 0,22  $\mu$ m).

As suspensões de *Trichoderma* spp. foram obtidas por meio da lavagem com água esterilizada de colônias cultivadas em placas de Petri com BDA, durante sete dias, em condições ambiente de laboratório.

Para a inoculação do patógeno foi utilizada a suspensão de conídios, obtida por meio da lavagem com água esterilizada de colônias cultivadas em placas de Petri com BDA, durante trinta dias, em condições de laboratório.

### 3.3.1 TESTE COM OS ANTAGONISTAS EM FOLHAS DESTACADAS

Para a realização desse teste foram utilizadas cinco caixas tipo gerbox, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 0,6% de cloro ativo, onde foram colocadas duas folhas de papel filtro umedecido em água esterilizada, em cada caixa. Sobre as folhas de papel de filtro, colocaram-se duas folhas de erva-mate, coletadas da parte intermediária das mudas produzidas em casa de vegetação, com o pecíolo envolvido por algodão umedecido com água esterilizada. Foram estabelecidas dez repetições por tratamento.

As suspensões de *Trichoderma* spp. foram pulverizadas em concentrações de  $6,4 \times 10^6$ ;  $3,6 \times 10^7$  e  $3,0 \times 10^7$  conídios/ml, dos isolados T-1, TSS-9 e T-12, respectivamente. Para os isolados de bactérias, as concentrações utilizadas oscilaram entre  $2,0$  e  $3,1 \times 10^9$  células/ml. As pulverizações foram feitas na face abaxial das folhas de erva-mate e, 24 horas após, pulverizou-se o patógeno, por meio de uma suspensão de  $3,9 \times 10^5$  conídios/ml. As folhas permaneceram em ambiente de laboratório por onze dias, quando fez-se a avaliação do experimento, verificando-se a percentagem de incidência de lesões nas folhas. A testemunha consistiu na pulverização apenas com água esterilizada.

### 3.3.2 TESTE COM OS ANTAGONISTAS EM MUDAS

Para este teste foram utilizadas dez mudas por tratamento, produzidas em sacos plásticos de 7,5 x 15 cm com substrato solo-adubo, com cerca de seis meses de idade. As mudas foram cultivadas em casa-de-vegetação, apresentando-se em bom estado fitossanitário, vigorosas e uniformes em altura e número de folhas, que foram distribuídas em caixas plásticas (55 x 35 x 26 cm). Uma camada aproximada de 10 cm de serragem de madeira, umedecida foi colocada no fundo das caixas para separá-las, mantê-las em posição vertical e para facilitar a formação da câmara úmida. As caixas permaneceram encobertas com plásticos formando a câmara úmida, durante o período de incubação, em casa de vegetação sem temperatura controlada.

As concentrações e formas de preparo dos antagonistas, bem a aplicação dos mesmos e do patógeno foram as mesmas utilizadas no item 3.3.1. Decorridas 24 horas da aplicação dos antagonistas, as mudas foram inoculadas com suspensão de conídios do patógeno contendo  $3,9 \times 10^5$  conídios/ml. Entretanto, decorridos dez dias da inoculação, não se observou sintomas da doença em nenhuma muda. Considerou-se que a inoculação não obteve sucesso. Assim, onze dias depois repetiu-se a inoculação. A avaliação final foi feita oito dias depois da inoculação do patógeno, verificando-se a presença ou não de lesões nas folhas.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PELAS BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS A *Cylindrocladium spathulatum*

O isolado B-1, que apresentou 78,3% de inibição, foi superior a todos os demais, seguido dos isolados AP-49, B-3, AP-51, B-2 e B-5, estes, iguais estatisticamente entre si, que apresentaram percentagem de inibição superior a 50%, sendo portanto, considerados de bom potencial antagônico (Tabela 2). Os isolados B-10 e B-4, com 49,4% e 47,0% de inibição, respectivamente, não diferiram estatisticamente entre si, também apresentaram um potencial antagônico satisfatório, seguidos do isolado AP-3, com 41,0% de inibição. Os isolados B-6, B-8 e B-9, que foram estatisticamente similares entre si, não inibiram o crescimento do patógeno.

Pelos resultados apresentados, os isolados B-1, AP-49 e B-3 foram selecionados para os testes em folhas e em mudas.

### 4.2 PAREAMENTO DOS FUNGOS ANTAGÔNICOS A *Cylindrocladium spathulatum*

Os isolados TSS-9 e T-12 foram superiores, ambos com 97,55% de colonização. Com menor potencial e estatisticamente similares entre si, estão os isolados T-4, TSS-3, T-6, T-19, TSS-13, T-14, T-15, T-15E e T-1, que apresentaram inibição variando entre 81,47 e 67,92%, podendo ser considerados de bom potencial antagônico. O isolado T-4, porém, apresentou crescimento irregular, de forma salpicada no meio de cultura, características que inviabilizaram a sua escolha para os testes de controle (Tabela 3).

Os dois melhores isolados, são exógenos e, pertencentes ao gênero *Trichoderma* e entre os demais, que ocuparam a posição seguinte, estatisticamente similares entre si, se destacaram os isolados TSS-3, T-19, TSS-13, T-15 e T-15E, também de *Trichoderma* sp., que são exógenos. Além destes, se destacou o isolado T-1, também pertencente ao mesmo gênero, porém, residente em cultura de erva-mate. Entre os demais na mesma posição, destacaram-se outros fungos residentes não identificados. Então, foram escolhidos para os testes em folhas destacadas e em mudas, os dois melhores isolados, TSS-9 e T-12 (exógenos) e, um terceiro, residente da região de ocorrência e com um bom percentual inibição. Então, optou-se pelo isolado T-1.

TABELA 2 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Cylindrocladium spathulatum* POR BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS

Isolado antagônico	Diâmetro da colônia (mm)	Inibição em relação à testemunha (%)
B-6 *	90,0 a	-
B-8 *	90,0 a	-
B-9 *	90,0 a	-
Testemunha	82,2 b	-
AP-3 **	48,5 c	41,0
B-4 *	43,6 d	47,0
B-10 *	41,6 d	49,4
B-5 *	41,3 de	49,8
B-2 *	40,9 de	50,2
AP-51 **	40,4 de	50,9
B-3 *	40,3 de	51,0
AP-49 **	37,2 e	54,7
B-1 *	17,8 f	78,3

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Coeficiente de variação = 5,71%.

\* bactéria não identificada

\*\* *Bacillus subtilis*

TABELA 3 - COLONIZAÇÃO DE *Cylindrocladium spathulatum* POR FUNGOS ANTAGÔNICOS

Isolado antagônico	Colonização (%)
TSS-9 **	97,55 a
T-12**	97,55 a
T-4*	81,47 b
TSS-3**	75,00 bc
T-6*	75,00 bc
T-19**	75,00 bc
TSS-13**	75,00 bc
T-14*	75,00 bc
T-15**	75,00 bc
T-15E**	75,00 bc
T-1**	67,92 bcd
T-7*	61,53 cd
T-2**	60,40 cd
T-8*	50,00 d
T-5*	50,00 d
T-10*	50,00 d
T-11*	50,00 d
T-16*	25,00 e

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Coeficiente de variação = 13,94%.

\* fungo não identificado

\*\* *Trichoderma* sp.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PELOS ANTAGONISTAS

Não houve inibição significativa do crescimento do *C. spathulatum*, portanto conclui-se que os antagonistas não produziram metabólitos não voláteis suficientes para a inibição do crescimento micelial do patógeno (Tabela 4). Provavelmente, este tipo de teste não seja adequado para a avaliação desejada.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Todos os antagonistas inibiram o crescimento micelial do patógeno e diferiram da testemunha. As bactérias foram mais eficientes na produção de metabólitos voláteis, em relação aos isolados de *Trichoderma* sp. (Tabela 5).

TABELA 4 - EFEITO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ANTAGONISTAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Cylindrocladium spathulatum*

Isolado antagônico	Diâmetro da colônia (mm)	Inibição em relação à testemunha (%)
B-1*	42,62 a	-
B-3*	41,25 ab	-
AP-49**	41,00 abc	-
T-1***	40,00 abcd	-
Testemunha	39,00 bcd	-
TSS-9***	38,00 cd	2,6
T-12***	37,00 d	5,1

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% significância.  
Coeficiente de variação = 4,34%

\* bactéria não identificada

\*\* *Bacillus subtilis*

\*\*\* *Trichoderma* sp.

TABELA 5 - EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR ANTAGONISTAS SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *Cylindrocladium spathulatum*

Isolado antagônico	Diâmetro da colônia (mm)	Inibição em relação à testemunha (%)
Testemunha	72,50 a	-
T-12***	16,80 b	76,8
TSS-9***	13,40 bc	81,5
T-1***	13,40 bc	81,5
B-1*	9,90 c	86,3
B-3*	9,80 c	86,5
AP-49**	9,30 c	87,2

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.  
Coeficiente de variação = 21,20%

\* bactéria não identificada

\*\* *Bacillus subtilis*

\*\*\* *Trichoderma* sp.

#### 4.5 INIBIÇÃO DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

De um modo geral, houve maior inibição da germinação de conídios com o aumento da concentração dos metabólitos de bactérias, independente da forma de preparo, isto é autoclavado e não autoclavado. Mesmo na menor concentração utilizada (10%), o efeito dos metabólitos foi significativamente diferente da testemunha, exceto para B-1N 10%. Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os antagonistas (Tabela 6).

O isolado B-1 na forma autoclavado nas concentrações 50 e 100% foi igual à forma natural 100%, onde conclui-se que a sua eficiência não foi alterada pela autoclavagem. Também o isolado B-3 não foi influenciado, pois não houve diferença entre as formas de preparo, isto é, autoclavado e natural, nas concentrações equivalentes do caldo.

Entretanto o isolado AP-49 (*B. subtilis*) teve sua eficiência afetada na forma autoclavado, pois nas concentrações 50 e 100%, a percentagem de inibição nesta forma de preparo ficou abaixo de 87%, enquanto que na forma natural, nas mesmas concentrações, a inibição foi acima de 96%.

Na Tabela 7 são apresentados os dados obtidos nos testes realizados com os isolados de *Trichoderma* sp., onde observa-se, que não inibiram a germinação dos conídios, pois não houve diferenças significativas entre eles e a testemunha.

TABELA 6 - EFEITO DE BACTÉRIAS ANTAGÔNICAS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS (%) DE *Cylindrocladium spathulatum*

Isolados/concentração	Germinação de conídios (%)	Inibição de germinação em relação à testemunha (%)
Testemunha	93,58 a	-
*B-1N 10%	55,05 ab	41,2
*B-1N 50%	9,91 bc	89,4
*B-1N 100%	9,10 c	90,3
*B-1A 10%.	16,99 bc	81,8
*B-1A 50%.	6,69 c	92,9
*B-1A 100%	6,97 c	92,6
*B-3N 10%	18,99 bc	79,7
*B-3N 50%	6,41 c	93,2
*B-3N 100%	6,00 c	93,6
*B-3A 10%	14,54 bc	84,5
*B-3A 50%	2,92 c	96,9
*B-3A 100%	8,77 c	90,6
**AP-49N-10%	12,19 bc	87,0
**AP-49N 50%	2,00 c	97,9
**AP-49N 100%	3,74 c	96,0
**AP-49A 10%	35,14 bc	62,4
**AP-49A 50%	19,38 bc	79,3
**AP-49A 100%	12,93 bc	86,2

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação = 32,20%.

\* bactéria não identificada

\*\* *Bacillus subtilis*

N - caldo natural (não autoclavado)

A - caldo autoclavado

% - concentração do caldo em relação à concentração original

TABELA 7 - EFEITO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS DE *Trichoderma* sp. SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Cylindrocladium spathulatum*

Isolados	Germinação de conídios (%)	Inibição de germinação em relação à testemunha (%)
T-12	99,63 a	-
Testemunha	98,54 a	-
TSS-9	98,25 a	0,3
T-1	97,77 a	0,8

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Coeficiente de variação = 6,81%

#### 4.6 TESTE COM OS ANTAGONISTAS EM FOLHAS DESTACADAS

Os isolados de *Trichoderma* sp. não foram eficientes no controle da doença (Figura 2). A incidência da doença em mudas tratadas com o isolado T-1 foi de 90% e de 80% com os antagonistas T-12 e TSS-9, praticamente igual à incidência da testemunha (90%).

Os isolados de bactérias demonstraram ser mais eficientes que os isolados de *Trichoderma*. O melhor deles foi o isolado AP-49, na forma natural, com 40% de incidência, 70% na forma autoclavado e 90% quando filtrado, seguidos pelos isolados B-1 e B-3. O antagonista B-1, que apresentou 50% de incidência na forma natural, teve sua incidência elevada para 70% na forma filtrado e 100% quando autoclavado. O antagonista B-3, apresentou 50% de incidência na forma filtrado, 70% na forma natural e 80%, quando autoclavado.

#### 4.7 TESTE COM ANTAGONISTAS EM MUDAS

O isolado T-12 foi o mais eficaz, dentre os isolados de *Trichoderma*, cujas mudas tratadas apresentaram 20% de incidência da doença, contra 90% verificado na testemunha, enquanto que os isolados TSS-9 e T-1 apresentaram 60 e 70% de incidência, respectivamente (Figura 3).

O isolado AP-49, foi o mais eficaz dentre os isolados de bactérias em todas as formas de preparo. A incidência da doença em mudas tratadas foi de 10% nas formas natural e filtrado e 20% na forma autoclavado. Seguiram-se os isolados B-1 com 10% de incidência na forma natural e 50% nas formas filtrado e autoclavado e na sequência, e o isolado B-3, cujas mudas apresentaram incidência de 20% na forma natural, 50% na forma autoclavado e 80% na forma filtrado.



FIGURA 2 - EFEITO DE ANTAGONISTAS SOBRE A INCIDÊNCIA DE *C. spathulatum* EM FOLHAS DESTACADAS DE ERVA-MATE

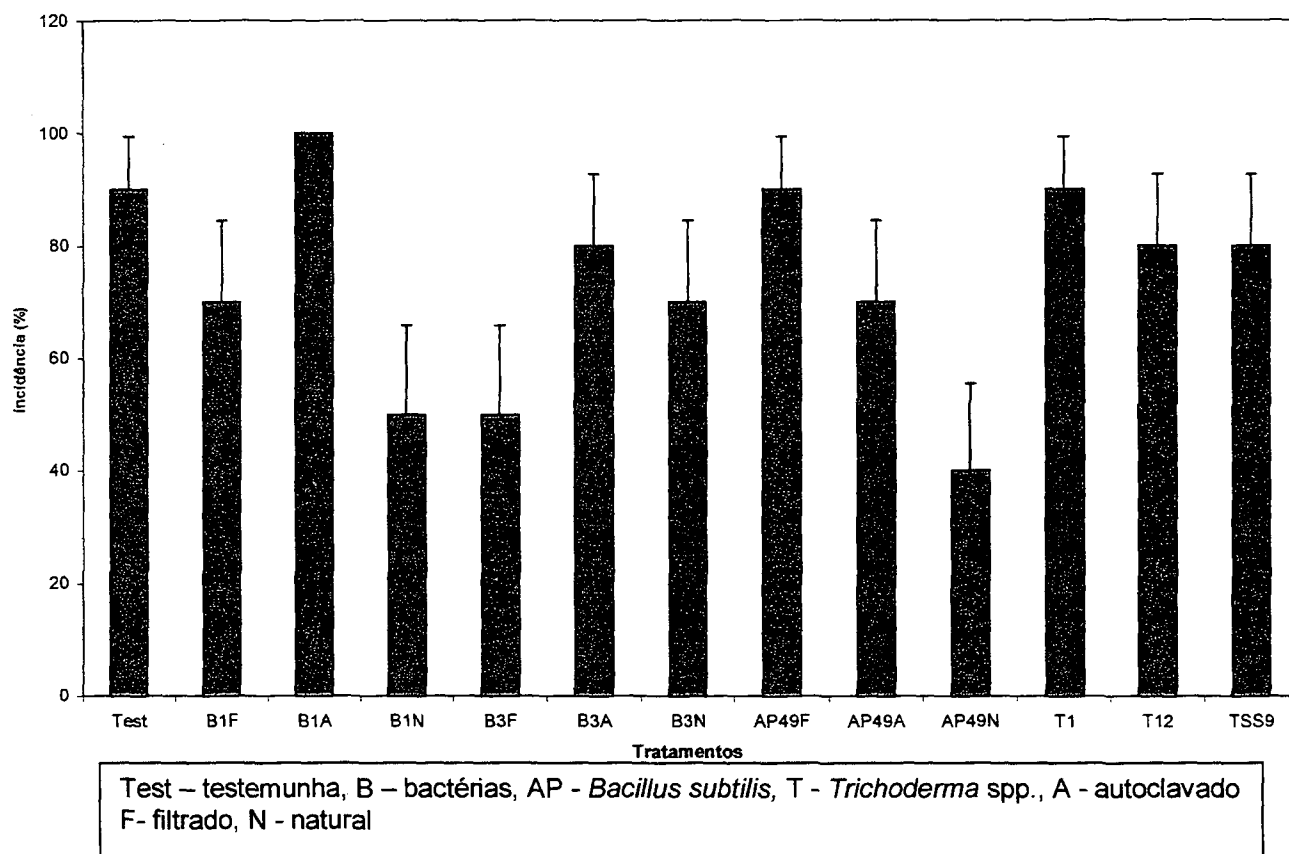
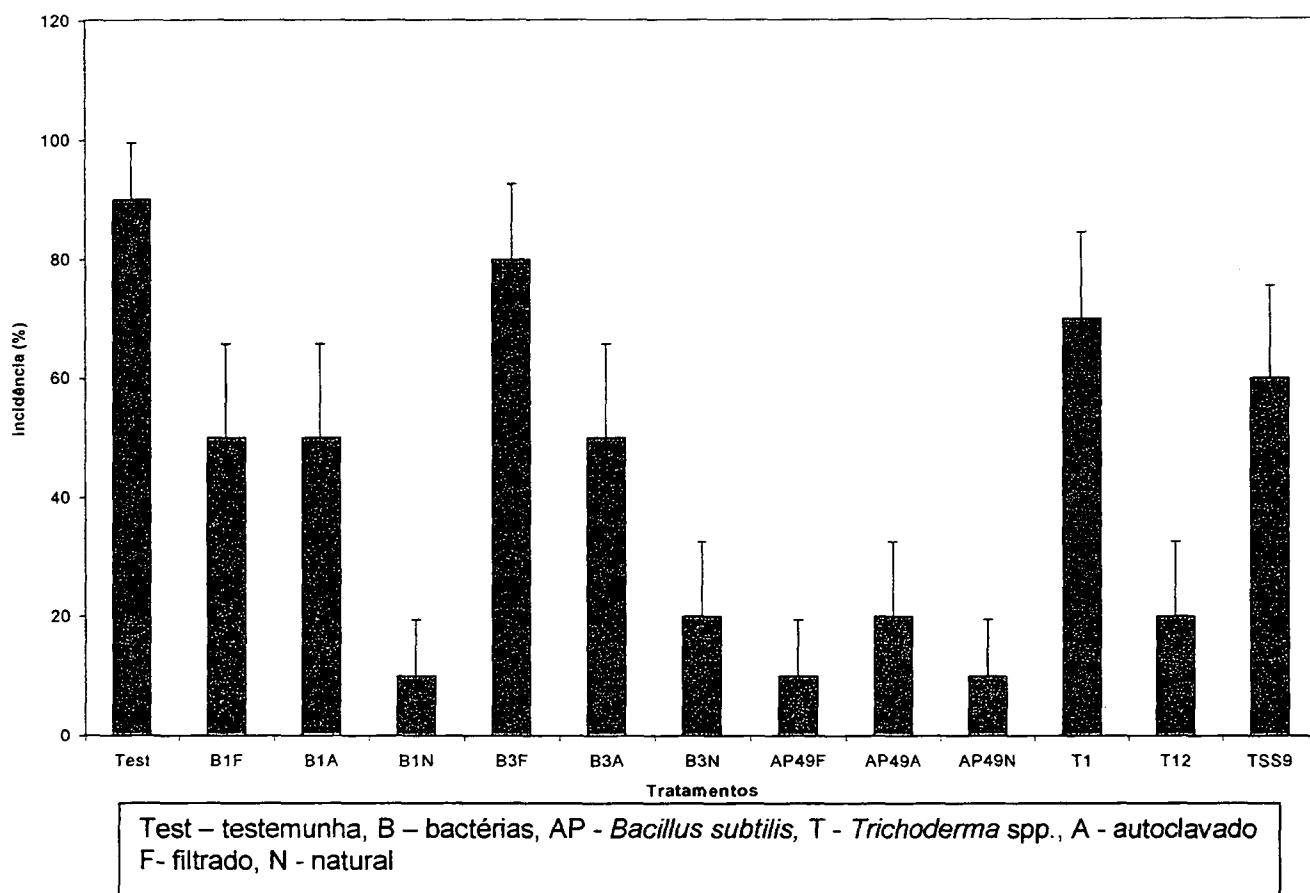


FIGURA 3 - EFEITO DE ANTAGONISTAS SOBRE A INCIDÊNCIA DE *Cylindrocladium spathulatum* EM MUDAS DE ERVA-MATE



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 TESTES *IN VITRO*

Dentre os testes desenvolvidos *in vitro*, a produção de antibióticos pelas bactérias apresentou resultados que se confirmaram em folhas destacadas e em mudas, primeiramente pelo antagonista B-1 e a seguir pelo AP-49 e B-3, que foram eficientes na inibição do crescimento micelial do patógeno. Estes, também foram mais eficazes para inibir a germinação de conídios, principalmente em concentrações 50 e 100% nas formas natural e autoclavado. Entretanto com *Trichoderma*, os bons resultados obtidos no teste por pareamento não se confirmaram na inibição de germinação de conídios. Isto vem reforçar as afirmações que MICHEREFF et al. (1993a) fez a respeito do biocontrole no patossistema *C. graminicola*-sorgo, quando se observou apenas a inibição no crescimento micelial do patógeno *in vitro*, fato não verificado em estudos conduzidos em casa-de-vegetação, confirmando a baixa eficiência de *Trichoderma* no controle de doenças foliares.

Os dados obtidos sobre os metabólitos voláteis confirmaram os resultados obtidos anteriormente na inibição do crescimento micelial pelas bactérias, na inibição de germinação de conídios e, também, no controle em folhas destacadas e em mudas.

Dos testes *in vitro*, o método considerado mais eficiente e prático para avaliar o grau de antagonismo, foi a inibição de germinação de conídios, pois demonstrou que a incidência da doença está diretamente relacionada à germinação dos conídios no filoplano, a exemplo de BETTIOL & VARZEA (1992) que demonstraram a efetividade de *B. subtilis* em inibir a germinação de uredíniosporos de diferentes

raças de *Hemileia vastatrix* e em controlar a ferrugem em condições de casa-de-vegetação.

## 5.2 TESTES *IN VIVO*

No teste realizado em folhas, obteve-se o melhor controle quando os antagonistas foram aplicados na forma natural, em relação às demais formas de preparo testadas. Também foi observado que os metabólitos dos isolados de bactérias são termolábeis (caldo autoclavado) perdendo sua eficiência com a ausência de células (caldo filtrado), fatores estes que foram importantes para limitar o poder antagônico das bactérias. Estas formas de preparo mostraram-se inadequadas no uso de metabólitos, para o controle de *C. spathulatum*.

Os isolados de *Trichoderma* não foram efetivos para inibir a germinação conídios de *C. spathulatum*, apesar do alto grau hiperparasitismo observado em placa de Petri. Provavelmente, o mecanismo de ação para evitar a doença é a inibição da germinação de conídios do patógeno, segundo MELO (1996). Como os conídios germinaram nas folhas, houve a colonização e a formação de lesões. A esse respeito, o autor comentou sobre as dificuldades de *Trichoderma* em se adaptar ao filoplano. Esta dificuldade pode ser observada apesar dos resultados bons obtidos nos experimentos *in vitro*, por meio do pareamento e na presença de metabólitos voláteis, e a falta de controle em folhas destacadas.

Na realização do teste em mudas, houve ausência de sintomas da doença, quando da 1ª inoculação, inclusive na testemunha (somente patógeno) que provavelmente deve ter sido causada pelas altas temperaturas verificadas no período, aliada à umidade que, deve ter sido insuficiente para a germinação dos

conídios do patógeno. A repetição da inoculação do patógeno dez dias após a 1ª inoculação, mostrou que os antagonistas permaneceram ativos mesmo após esse período.

Apenas o isolado T-12 de *Trichoderma* sp. apresentou controle da doença em mudas. Como isto não ocorreu em folhas destacadas, seria necessária a confirmação de sua eficiência como pode ser visualizado na Figura 3. A dificuldade no controle de doenças foliares por *Trichoderma* sp. novamente se repetiu no teste com mudas de erva-mate, a exemplo da folha destacada.

Dos isolados de bactérias testadas em mudas, *Bacillus subtilis*, isolado AP-49, selecionado para o controle de *Pyricularia oryzae*, por meio da produção de antibióticos foi o antagonista mais efetivo no controle da pinta-preta em mudas de erva-mate (Figura 3). Sua eficiência foi comprovada nas três formas avaliadas, demonstrando que além de produzir metabólitos, esse são termoestáveis e agem tanto na presença como na ausência das células (Figura 3). Os isolados B-1 e B-3 só foram eficientes quando o caldo bruto foi aplicado demonstrando que seus metabólitos não são termoestáveis. Além disso, as mudas tratadas com caldo filtrado (ausência de células) apresentaram maior incidência da doença, demonstrando que as mesmas são importantes para o controle (Figura 3).

Verificou-se que, de uma forma acentuada, a inibição de germinação de conídios na presença dos caldos natural e autoclavado, em maiores concentrações, tal como SANTOS et al. (1998) encontraram no controle da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii* com *B. subtilis*. Esta inibição produzida, tanto em caldo natural como autoclavado, confirmou a termoestabilidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis*, independentemente portanto da presença de células vivas. Este fato foi também observado com o isolado AP-49, no teste com mudas. Entretanto

no teste com folhas destacadas, a eficiência deste isolado foi diferente quando utilizado nas formas autoclavado e filtrado, conforme foi verificado por BETTIOL & KIMATI (1990).

Avaliando-se todos os testes realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, observou-se que o realizado em folhas destacadas, foi o mais prático e econômico e, ainda dispensou menos tempo que os demais. Por estas características, esse método poderia ser recomendado para se avaliar o potencial antagonico. Os resultados obtidos na inibição de germinação de conídios, que foi o mais prático e funcional dos testes *in vitro*, também se consumaram em mudas. Por meio do teste em folhas destacadas, pode-se avaliar, em laboratório, um grande número de antagonistas durante todo o ano, pois a erva-mate é uma espécie com folhas perenes, disponibilizando material em qualquer período desejado.

Ponderando-se todos os fatores que podem viabilizar o uso de antagonistas no controle da pinta-preta em erva-mate, sugere-se a aplicação do antagonista AP-49 (*Bacillus subtilis*) na forma natural, em viveiros, por ser a forma mais eficiente e operacionalmente prática.

No entanto, deve ser ressaltado que para validar os resultados, alguns testes deverão ser realizados em viveiro e, se possível, em campo, para comprovar a eficiência do controle.

Esta foi a primeira tentativa de se buscar agentes de controle biológico contra *C. spathulatum* em erva-mate, espécie florestal de grande importância comercial para a região sul do Brasil, sendo um importante passo para o manejo integrado de doenças, onde se busca a minimização do uso de agrotóxicos com conseqüente proteção à saúde humana e ao meio ambiente.

## 6 CONCLUSÕES

- Os métodos *in vivo* foram considerados mais adequados para a seleção de antagonistas que os métodos *in vitro*.
- O método de folhas destacadas, utilizado para a seleção de antagonistas, foi eficiente, pois equiparou-se ao método de inoculação de mudas.
- Os isolados de bactérias, de um modo geral, foram mais eficientes que os isolados de *Trichoderma*.
- O isolado AP-49 de *Bacillus subtilis* foi o mais eficaz de todos os antagonistas, em todas as formas de preparo para o controle da pinta-preta em erva-mate.
- Dos isolados de *Trichoderma* testados, apenas o isolado T-12 apresentou algum resultado em mudas, mas não controlou o patógeno em folhas destacadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D.E.G.T.; SILVA, E.B.; MICHEREFF, S.J. ; MARIANO, R.L.R.; BETTIOL, W. Controle da queima das folhas de inhame com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.21, p.202-205, 1995.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças da erva-mate. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.21, n.3-4, p.195-198, 1995.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, p.770-722, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, p.1148-1152, 1983.
- BELL D.K.; WELLS H.D.; MARKHAM C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v.72, n. 4, p.379-382, 1982.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba, 1988. Tese (Doutorado) - ESALQ-USP.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991a. p.1-5.



- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991b. p.223-236.
- BETTIOL, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.5, p.59-97, 1997.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Seleção de microrganismos antagônicos à *Pyricularia oryzae* para o controle da brusone do arroz. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.15, n.3-4, p.257-266, 1989.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.8, p.1165-1174, 1990.
- BETTIOL, W.; VARZEA, V.M.P. Controle Biológico da Ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.91-95, 1992.
- BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B.; SAITO, M.L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.18, n.2, p.153-159, 1992.
- BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. Jaguariúna, v.20, n.2 , p.119-122, 1994.
- BETTIOL, W.; AUER, C.G; CAMARGO, L.E.A.; KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium*

com *Bacillus* sp. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna. v.14, n.3-4, p.210-218, 1988.

CENTURION, M.A.P.C.; KIMATI, H. Controle biológico da ferrugem do feijoeiro com bactérias antagônicas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, n.3-4, p.179-183, 1994a.

CENTURION, M.A.P.C.; KIMATI, H. Seleção e identificação de microrganismos antagônicos a ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.20, n.3-4, 174-178, 1994b.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. **Micotaxon**, Apopka, v.51, 409-411, 1994.

ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, p.119-121, 1980.

FERREIRA, F.A. Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa. **Sociedade Brasileira de Investigações Florestais**, 1989. 570p.

GHINI, R.; VITTI, A.J. Controle integrado de *Botrytis cinerea* na cultura do morango. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, p.10-13, 1993.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Doenças da erva-mate: identificação e controle. Colombo: EMBRAPA-CNPf, **Circular Técnica**, 25, 18p., 1996.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G.; MASCHIO L.M.A. Doenças em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) na Região Sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.32/33, p.43-51, 1996.

- GRILLO, H.V.S. Lista preliminar dos fungos assinalados em plantas do Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v.2. p.39-96, 1936.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HEINS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69 p.64-68, 1979.
- HUNTER, B. B. ; BARNETT; H.L. Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. **Mycologia**. v.70, p. 614-635, 1978.
- LAU, D.; GRIGOLETTI JUNIOR A. Patogenicidade de *Cylindrocladium spathulatum* em espécies de *Ilex* e *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v.22., Supl., p.274, 1997.
- MARCHIONATTO, J.B. **Tratado de Fitopatologia**. Buenos Aires: Libreria del Colegio, 537p., 1948.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas.. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.1, p. 369-409, 1993.
- MAUBLANC, M.A. Rapport sur les maladies observeés au Laboratoire de Phytopathologie du Museu National de Rio de Janeiro. **Bulletin Mensuel des Renseignements Agricoles et des Maladies des Plantes**, Roma, v.4, n.7, p.876-879, 1913.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.135-56.

- MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 4, p.261-295, 1996.
- MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M. & MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.14-17, 1993a.
- MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Potencial de *Trichoderma* spp. para o controle da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.392-398, 1993b.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J.J.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U. G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.540-544, 1995.
- NOWACKI, M.J. Alguns fungos parasitas de erva-mate (*Ilex* sp.) no Paraná. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. Curitiba, v.9, n. 6, p.83-89, 1954.
- ROCHA, J.R.S.; OLIVEIRA, N.T. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis*). com *Trichoderma koningii* **Summa Phytopathologica**. Jaguariúna, v.24, n.3-4, p.272-275, 1998.
- RODIGHERI, H.R.; SCCHOLOSSNACHER NETO, L.; CICHACZEWSKI, I.F. Custos, produtividade e renda de erva-mate cultivada na região de Guarapuava, PR., Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1996. 22p. (EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, 24).

- SANTOS, C.F.C., CASTRO, H.A., BETTIOL, W.; ANGELI JÚNIOR, A. Sensibilidade *in vitro* de urediniósporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. Jaguariúna, v.24, n.2 p.183-185, 1998.
- SPEGAZZINI, C. Hongos de la yerba-mate. **Anales del Museo Nacional de Buenos Aires**. Buenos Aires, Ser. 3a, n.10, p.111-141, 1908.
- VELLOZO, L.G.C.; NOWACKI, M.J.; VERNALHA, M.M. Contribuição ao levantamento fitossanitário do Estado do Paraná. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. Curitiba, v.4, n.2, p.9-24, 1949.
- ZIMAND, K.G.; ELAD, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Saint Paul, v.86, p.1255-1260, 1996.